

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-281230

(43)公開日 平成5年(1993)10月29日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 33/543  
33/553

識別記号

D 9217-2 J  
9015-2 J

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数5(全 7 頁)

(21)出願番号

特願平3-103787

(22)出願日

平成3年(1991)4月8日

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 黒田 知之

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 柴田 秀司

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡  
績株式会社総合研究所内

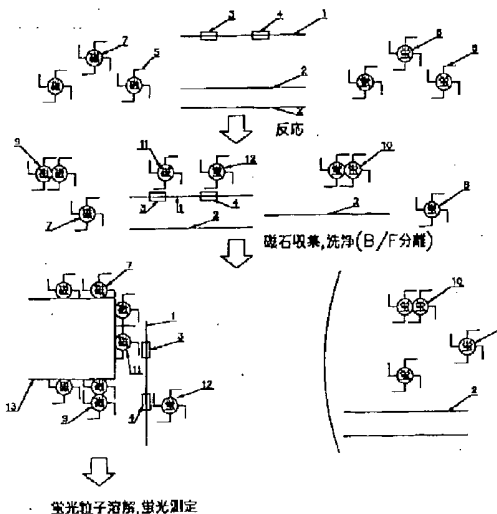
(54)【発明の名称】 リガンド・レセプター反応の高感度検出法

(57)【要約】

【目的】 リガンド反応による微粒子の凝集を、微粒子の自然凝集から分離区別して低濃度のリガンドまでも測定する。

【構成】 被検物質中の特異性のある部分に選択的に結合する物質を結合させた蛍光微粒子と、被検物質中の上記部分とは異なる、特異性のある部分に選択的に結合する物質を結合させた磁性微粒子と、被検物質を含む試料溶液の3つを所定時間、所定温度で反応させ、被検物質に蛍光微粒子と磁性微粒子の両者を特異的に結合させ、得られた混合液を磁場中に置き、磁性微粒子および蛍光微粒子と磁性微粒子の凝集体と、磁性を持たない蛍光微粒子とを分離し、次いで蛍光微粒子を溶解し、蛍光性溶液の蛍光強度より、被検物質により生じた蛍光微粒子と磁性微粒子の凝集体数を算出し、試料溶液中の被検物質濃度を算出する。

【効果】 磁力を用いて未反応の蛍光微粒子を除去し、反応した蛍光微粒子を蛍光光度計で測定し、高感度測定を行う。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料溶液中の被検物質濃度を以下の工程からなるリガンド・レセプター反応を利用して測定するリガンド・レセプター反応の高感度検出法。

a. 被検物質中の特異性のある部分〔a〕に選択的に結合する物質を結合させた蛍光波長〔X〕の蛍光微粒子〔A・X〕と、被検物質中の上記〔a〕とは異なる、特異性のある部分〔b〕に選択的に結合する物質を結合させた磁性微粒子〔B・M〕と、被検物質を含む試料溶液の3つを所定時間、所定温度で反応させ、被検物質に

10 蛍光微粒子〔A・X〕と磁性微粒子〔B・M〕の両者を特異的に結合させ、  
b. 工程a. で得られた混合液を磁場中に置き、磁性微粒子〔B・M〕及び蛍光性微粒子〔A・X〕と磁性微粒子〔B・M〕の凝集体と磁性を持たない蛍光微粒子〔A・X〕とを分離し、

c. 蛍光微粒子〔A・X〕を溶解する溶解液を磁性微粒子と結合した蛍光微粒子に加え、蛍光性の溶液を作成し、

d. 上記蛍光性溶液の蛍光強度より、被検物質により生じた〔A・X〕・〔B・M〕の凝集体の数を算出し、試料溶液中の被検物質濃度を算出する。

【請求項2】 被検物質がDNAあるいはRNAであり、選択的に結合する物質がオリゴヌクレオチドである請求項1のリガンド・レセプター反応の高感度検出法。

【請求項3】 被検物質が抗原または抗体であり、選択的に結合する物質が対応する抗体または抗原である請求項1のリガンド・レセプター反応の高感度検出法。

【請求項4】 被検物質が生理活性物質であり、選択的に結合する物質がそのレセプターである請求項1のリガンド・レセプター反応の高感度検出法。

【請求項5】 蛍光微粒子〔A・X〕及び磁性微粒子〔B・M〕を組み込んだことを特徴とする、試料溶液中の被検物質濃度をリガンド・レセプター反応を利用して測定するリガンド・レセプター反応の高感度検出キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、特異的結合を利用する試料溶液中の被検物質濃度を検出する方法およびこの方法を実施するための測定キットに関する。この発明は特に、分析物がいわゆる「サンドイッチ」反応の関与により分析されるリガンド・レセプター検出法に適用可能である。

【0002】本発明は特異的結合を利用するリガンド・レセプター検出法として、具体的には抗原抗体反応を利用するイムノアッセイ、核酸の相補性を利用する核酸プローブ測定、ホルモンその他生理活性物質とそのレセプターの特異的結合を利用する測定などへの適用が可能である。本発明を用いることにより、これら高感度ではあ

るが複雑な手技を要する測定を、迅速且つ容易に行なうことができる。本発明はまた特異性の高い測定法として、遺伝病、癌、感染症、代謝異常症などの診断への応用が期待される。

## 【0003】

【従来の技術】リガンド・レセプター検出法は特異性の高い測定法であり、遺伝病、癌、感染症、代謝異常症などの診断のために有効な手段として汎用されるようになってきた。抗原抗体反応を利用するイムノアッセイは、CEA、AFPを初めとする腫瘍マーカーの測定、TSH、インシュリン等のホルモン測定、B型肝炎ウイルス、ロタウイルス等の病原性微生物の検出、毒素原性大腸菌毒素、Clostridium difficile 毒素等の病原因子の検出、感染症における抗体の生成を見る抗体検査等広い範囲で実施されている。

【0004】核酸の相補性を利用する核酸プローブ測定は、近年特異性の高い測定法として広く用いられるようになってきた。例えばB型肝炎、C型肝炎、AIDSなどのウイルス感染症、パピローマウイルス、クラミジア、淋菌などの性感染症、また、ガン遺伝子、ガン抑制遺伝子などガン関連遺伝子、血友病、筋ジストロフィーなど先天性遺伝子疾患、糖尿病、高血圧などの診断、遺伝子異常など広範に利用されるようになってきた。またホルモン、生理活性物質とその受容体を用いる特異的測定法も用いられるようになってきた。例えば、糖類を含む物質とレクチンとの反応、インターロイキン2とそのレセプター、アセチルコリンとそのレセプター、またビオチンとアビジンなどもこの範疇に入る。またコレラ毒素、毒素原性大腸菌の易熱性毒素が腸管のガングリオシドに結合することから、このガングリオシドを用いたこれらの毒素の測定法も報告されている。

【0005】これらの測定法は感度の高い手法として近年急速な進歩を遂げた測定法である。これらの手法の多くはサンドイッチ法と呼ばれる測定法を用いている。すなわち、測定対象となるリガンドを二種類のレセプターで挟み込んで測定する。レセプターの一方を不溶性の担体に結合担持し、他方のレセプターに測定可能な標識を結合させて測定対象のリガンドと反応させる。この時リガンドを固相レセプターと標識レセプターで挟み込むように特異的に反応して、固相レセプターーリガンドー標識レセプターの結合が生じ、結果として標識物質が固相に結合される。この固相に結合した標識物質の量は、検体中の測定対象となるリガンドの量に比例し、この標識物質の量を測定することによりリガンドの量を測定することができる。

【0006】固相としては、ポリスチレン、ナイロン、アクリルアミド、デキストラン、アガロースなどのポリマーサポートがよく用いられる。また赤血球なども用いられることがある。形状としては、ラテックスビーズ、マイクロプレート、試験管、膜など多岐にわたってい

る。

【0007】標識物質として放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、酵素基質などが一般に用いられている。またラテックスビーズなどではラテックス同士の凝集を測定する場合もある。標識物質の数が検出法の感度を大きく左右するが、標識物質は一般にレセプター1分子当り1分子~数十分子、特別に多い場合でも数百分子であり標識物質の導入には制限がある。

【0008】これらの手法は一般には結合したもの(bound)と結合しなかったもの(free)を分離する操作を実施する。このB/F分離により高感度な測定が可能となる。この手法では遊離(free)の標識レセプターをどれだけ除くことができるかが大きなポイントとなっている。従ってB/F分離はこの手法においては重要であり、従ってその操作も複雑で、時間もかかる。B/F分離を行わない方法としてEMIT法(enzyme multiplied immunoassay technique)が報告された(Rubenstein, K.E. et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 846, 1972)。この方法では標識として酵素を用い、抗体が抗原と結合すると酵素の活性部位に変化が生じ(活性化または活性阻害)、その活性の変化を測定するというものである。同じ手法で酵素基質を抗原に標識として結合させた方法が商品化されている(SLFLA; Substrate-labeled fluorescent immunoassay; Ames 社)。これは、検体中の抗原と標識抗原を競合させると抗体と反応した標識基質は、立体障害のため後から添加した酵素の基質となりえず、遊離の標識抗原のみ酵素反応の基質となり、酵素による生成物の量が検体中の抗原の量に比例するという手法である。

【0009】また免疫蛍光偏光解消法と呼ばれる手法が開発された。本法では蛍光標識した抗原を抗体と反応させると蛍光標識抗原のブラウン運動が制限され、標識蛍光を偏光で励起すると偏光の解消が抑制されることを利用したものである。この場合、競合法を用いており、薬物、ハプテンのような低分子物質しか測定出来ず蛋白質等の高分子には応用できない。

【0010】一方、高分子のホモジニアスアッセイとしてペルオキシダーゼ標識を用いる方法がある。すなわち、ペルオキシダーゼを標識とし、酵素の活性測定時に基質である過酸化水素の濃度を高い状態に保つと、未反応すなわち遊離のペルオキシダーゼは高濃度の過酸化水素により阻害されて活性を示さず、一方抗原抗体反応により免疫複合体の中に取り込まれたペルオキシダーゼは立体障害により高濃度の過酸化水素にさらされることがなく活性を示すという方法である。しかしこの方法では溶血検体では血球中のカタラーゼ様活性により偽陽性を示すことが知られており、特異性上問題がある。

【0011】ラテックス凝集、赤血球凝集による測定では一般にB/F分離は行わないが、これらはスクリーニング検査として用いられており、感度は高くはない。ラ

テックス凝集を粒子計測装置で測定する方法が既に開示されている(前田真木子他; 日本臨床検査自動化学会誌, 14, 231, 1990., 特表昭63-502875号公報)。これらの手法は粒子を検出する際に、一つ一つの粒子が凝集粒子であるか非凝集粒子であるかを検出する方法であり、検出時に遊離(free)と結合(bound)を判断することができるので感度が高く、且つ前処理としての洗浄操作を必要としない簡便な方法である。この方法で高感度を達成するには、粒度分布のできるだけ小さな粒子を用いること、粒子が単粒子であるか、二個以上の複数粒子であるかを正確に検出することである。粒子の粒度分布をできるだけ小さく保つことは困難であり、これを達成することはそのまま粒子の製造コストに影響する。また、粒子が単粒子であるか、二個以上の複数粒子であるかを正確に検出することは、測定機器の測定精度を高くすることで可能であるが、高価な機器を必要とする。一方、粒子を単粒子として分散状態に保つこと、すなわち自然凝集による粒子の複数粒子化を抑制することが本法の感度向上につながるが、この粒子の分散は容易ではないので、リガンドの濃度が低く、凝集が非常に少ない場合、リガンドと反応して凝集したものか自然凝集によるものかの識別が困難であり、自然凝集の粒子数以下の測定は不可能となる。従って、この方法の測定感度は一般の酵素標識サンドイッチ法と大差がなく、放射性標識法より感度は低い。

#### 【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ラテックス凝集を粒子計測装置で測定する方法においてリガンドとの反応による粒子の凝集を、粒子の自然凝集から分離区別して測定し、低濃度のリガンドまでも測定できる高感度アッセイを達成する方法を提供することである。本発明の他の目的はリガンド・レセプター検出法においてレセプターに多量の標識を導入する方法を提供することである。本発明は更に当該検出方法に使用する測定キットも提供する。

#### 【0013】

【課題を解決するための手段】本発明は、試料溶液中の被検物質濃度を以下の工程からなるリガンド・レセプター反応を利用して測定するリガンド・レセプター反応の高感度検出法である。

a. 被検物質中の特異性のある部分[a]に選択的に結合する物質を結合させた蛍光波長[X]の蛍光微粒子[A・X]と、被検物質中の上記[a]とは異なる、特異性のある部分[b]に選択的に結合する物質を結合させた磁性微粒子[B・M]と、被検物質を含む試料溶液の3つを所定時間、所定温度で反応させ、被検物質に蛍光微粒子[A・X]と磁性微粒子[B・M]の両者を特異的に結合させ、

b. 工程a. で得られた混合液を磁場中に置き、磁性微粒子[B・M]及び蛍光性微粒子[A・X]と磁性微粒

子〔B・M〕の凝集体と磁性を持たない蛍光微粒子〔A・X〕とを分離し、

c. 蛍光微粒子〔A・X〕を溶解する溶解液を磁性微粒子と結合した蛍光微粒子に加え、蛍光性の溶液を作成し、

d. 上記蛍光性溶液の蛍光強度より、被検物質により生じた〔A・X〕・〔B・M〕の凝集体の数を算出し、試料溶液中の被検物質濃度を算出する。

【0014】また本発明は蛍光微粒子〔A・X〕及び磁性微粒子〔B・M〕を組み込んだことを特徴とする試料溶液中の被検物質濃度をリガンド・レセプター反応を利用して測定するリガンド・レセプター反応の高感度検出キットである。本発明においては、被検物質に特異的であり、被検物質の異なる部位に結合する異なる性質（蛍光と磁性）の微粒子で被検物質をサンドイッチ状態とし、磁力を用いて未反応の蛍光微粒子を除去し、反応した蛍光微粒子を蛍光光度計により測定する。

【0015】以下、本発明を詳細に説明する（図1参照）。試料溶液中の被検物質濃度を以下の工程からなるリガンド・レセプター反応を利用して測定するリガンド・レセプター反応の高感度検出法において、

a. 被検物質中の特異性のある部分〔a〕に選択的に結合する物質を結合させた蛍光波長〔X〕の蛍光性微粒子〔A・X〕と、被検物質中の上記〔a〕とは異なる、特異性のある部分〔b〕に選択的に結合する物質を結合させた磁性微粒子〔B・M〕と、被検物質を含む試料溶液の3つを所定時間、所定温度で反応させ、被検物質に蛍光性微粒子〔A・X〕と磁性粒子〔B・M〕の両者を結合させる。

【0016】試料中の被検物質とは、抗原抗体反応を利用するイムノアッセイでは抗原または抗体であり、核酸の相補性を利用する核酸プローブ測定ではDNAまたはRNAであり、生理活性物質とそのレセプターの特異的結合を利用する測定ではホルモンや毒素などである。被検物質中の特異性のある部分とは、被検物質の一部分で被検物質を代表する特異性を持った部分を言う。すなわち抗原抗体反応や核酸プローブ測定などにおいて他の物質と交差反応を示さない特定の部分を選択することが重要である。

【0017】蛍光微粒子とは蛍光物質を結合または含有する微粒子を言う。蛍光物質としてフルオレセイン、ローダミン6G、エオシンY等のキサンテン環含有染料、ウンベリフェロン、クマリン6等のクマリン環含有染料、アクリジン系染料、フィコエリスリン、アロフィコシアニン等のフィコビリ蛋白、ベンツイミダゾール環含有染料、フェナンスリジウム系染料、アジン系染料、チオキサンテン系染料、チアジン系染料、シアニン系染料、スチリル系染料、オキサジン系染料、トリアリールメタン系染料、ジアリールメタン系染料、その他などが選択される。また微粒子の素材としては、比重が0.9

～2.0で水溶液に分散できるものならば、どのような微粒子も用いることができる。例えばポリスチレン、ポリビニールトルエン、ポリメチルメタクリレート、ポリジビニールベンゼン、ポリアクロレイン、ポリブタジエン、及びこれらの混合組成の工業的ラテックス粒子、あるいはカジノキ花粉、キノコ胞子、鶏、羊等の固定赤血球、ヒト固定リンパ球、固定胸腺細胞等の生物学的粒子のようなものが選択される。このような蛍光微粒子として、例えばデュークサイエンティフィック（Duke Scientific Corp.）社のコバスフェアーズ（Covaspheres<sup>TM</sup>）蛍光粒子、バイオクリン（Bioclean）蛍光粒子、フローサイトメトリースタンド（Flowcytometry Standard Corp.）社のマイクロビーズアライメントスタンダード（Microbeads Alignment Standards）粒子、ローヌプーラン（Rhône-Poulenc Specialities Chimiques）社のシリー（Serie）PSI蛍光粒子、ポリサイエンス（Polyscience）社のフルオーズブライツカルボキシライト（Fluoresbrite<sup>TM</sup> Carboxylate）粒子、ポリビーズ（Polybead）蛍光微粒子、コールターエレクトロニクス（Coulter Electronics）社のフルオレッセントアライメントスタンダード（Fluorescent Alignment Standard）粒子、シグマ（Sigma）社のグルタルアルデヒド固定の鶏赤血球、七面鳥赤血球、オルソダイアグノスティック（Ortho Diagnostic）社のフルオロトロール（Fluorotrol）GF、その他などが選択される。

【0018】選択的結合物質と微粒子の結合は、二官能基の縮合反応や架橋反応として一般に知られた方法により容易に実施出来る。例えばグルタルアルデヒドによるアミノ基同士の架橋、カルボジイミドによるアミノ基とカルボキシル基との架橋による共有結合、アジドの光分解による挿入反応、アミノ基とトシル基の交換反応、アミノ基とカルボキシル基とのイオン結合などにより実施出来る。また微粒子表面は選択的結合物質を結合させた後に、不活性化処理を行なうことにより非特異的な結合を防止しておくことができる。この不活性化処理はサケ精子DNA部分分解物、ランダムオリゴヌクレオチド、ウシ血清アルブミンなどで処理する方法や未反応の官能基をエタノールアミンなど公知の方法で処理することにより達成される。

【0019】磁性粒子として磁性粉を含有する微粒子を用いることができる。これは例えばローンプーラン社のエスタボール（estapor）、ダイナル社のダイナビーズ（dynabeads）などが選択される。

【0020】b. 工程a. で得られた混合液を磁場中に置き、磁性微粒子〔B・M〕及び蛍光性微粒子〔A・X〕と磁性微粒子〔B・M〕の凝集体と磁性を持たない蛍光微粒子〔A・X〕とを分離する。本操作は反応液に磁場をかけることにより磁性を有する微粒子（磁性微粒子単独、磁性微粒子同士の非特異的凝集、及び被検物質を介した磁性微粒子と蛍光微粒子の結合物）と磁性を持

たない微粒子（蛍光微粒子単独、蛍光微粒子同士の非特異的凝集）を分離する。

【0021】c. 蛍光微粒子〔A・X〕を溶解する溶解液を磁性微粒子と結合した蛍光微粒子に加え、蛍光性の溶液を作成する。反応しなかった蛍光微粒子に蛍光微粒子溶解液を加え、蛍光物質を液中に溶解し、蛍光性溶液を得ることも可能である。蛍光微粒子を溶解する溶解液としては、微粒子の組成がポリスチレンなどの場合、NaOH、工業的ラテックス粒子の場合、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシド等の有機溶媒などを用いることができる。

【0022】d. 上記蛍光性溶液の蛍光強度より、被検物質により生じた〔A・X〕・〔B・M〕の凝集体の数を算出し、試料溶液中の被検物質濃度を算出する。

【0023】蛍光強度の測定は一般の蛍光光度計を用いて測定できる。一般にリガンド・レセプター検出法において、レセプターを固相に固定するために、反応速度は液相の反応に比べて遅くなることが知られている。しかし本発明では微粒子を用いることで反応速度の低下を抑制することが可能であり、反応液を攪拌することで更に抑制できる。従って固相を用いることによる反応速度低下の不利を抑えることができる。本発明の方法では、磁性を有する粒子を利用してB/F分離をした後に、蛍光微粒子を溶解液により溶解し蛍光を液相として測定することが可能である。

【0024】

【発明の効果】一般に蛍光測定は高感度の測定法として知られている。蛍光物質を標識物質としてサンドイッチ測定をすることもよく知られている。しかし蛍光標識では1分子のリガンドに対して、1分子のレセプターが反応しても標識物質の分子数はレセプター上の標識分子数に過ぎず、1～数百分子に過ぎない。従って蛍光測定は高感度であっても計測される蛍光分子の数は少ない。一方、蛍光微粒子を用いる方法では1個の蛍光微粒子中の蛍光物質含量は、蛍光量の多い粒子を選定すればFIT換算で $10^{10}$ 程度と大量に存在するが、微粒子中に存在するため懸濁液中では不均一な分散としており且つ微粒子中の全蛍光物質を測定することはできない。本発明はこの微粒子を溶解液により溶解し、均一な系として測定することにより微粒子中の全蛍光物質を効率よく測定でき、蛍光測定の高感度と1分子の反応に多量の蛍光を導入する標識法を兼ね備えた高感度測定法である。

【0025】本発明ではリガンド・レセプター測定において、蛍光粒子を標識として用い、この蛍光粒子を溶解し溶液として均一状態で測定することにより、レセプターに多量に標識を導入した場合と同等の効果を得ることができ、高感度測定を達成することができた。

【0026】

【実施例】以下に、本発明の実施例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとするが、こ

れら実施例によって本発明の範囲は限定されるものではない。

（実施例1）核酸プローブの調製

核酸プローブとして、腸炎ビブリオの耐熱性毒素に相補的なオリゴヌクレオチドを用いた。オリゴヌクレオチドは、DNA合成機 380A 型（アプライド・バイオシステムズ社）を用いて、ホスホアミダイト法により合成した。塩基配列は、次の通りであり、配列表1および2にも示した。

5'-CCCCGGTTCT GAXGAGATAT TGTN-3' (TDH1)

および

5'-CAGGTACTAA AXGGTTGACA TCCTN-3' (TDH2)

配列中Nは5位にリンカーアームを有するデオキシウリジンを示す。この5位にリンカーアームを有するデオキシウリジンは、特表昭60-500717 号公報に開示された合成法により、デオキシウリジンから化学合成により調製し、オリゴヌクレオチドに導入した。合成されたオリゴヌクレオチドは、27%アンモニア水で55℃、4 時間脱保護処理を施した後、陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーMono-Q FPLC（ファルマシア社）を用いて精製した。0.2  $\mu\text{mol}$  スケールの合成を行ない、約11.5A<sub>260</sub>（260nm における吸光度より求めた絶対量）のオリゴヌクレオチドを得た。

【0027】（実施例2）核酸プローブ結合性磁性粒子の調製

磁性粒子としてディノインダストリア社(Dyno Industries A. S., Norway)製XP-6006を用いた。磁性粒子100  $\mu\text{l}$  と実施例1で調製したTDH1プローブ132pmolを1mMホウ酸緩衝液(pH8) 中で混合し（最終液量200  $\mu\text{l}$ ）、37℃で4時間反応させ、250  $\mu\text{l}$  のモノエタノールアミン塩酸水溶液を加え、更に30分間反応させた。反応終了後、磁石で磁性粒子を集めて反応液を除去後、1mlの水で5回洗浄した後、789  $\mu\text{l}$  のHEPES緩衝液(20mM, pH7.0, 1% BSA を含む)に再懸濁し、超音波処理(20kHz, 50W, 2秒間)し、4℃で保存した。粒子に結合したプローブ数は以下の方法で測定した。TDH1プローブ結合緑蛍光粒子懸濁液10  $\mu\text{l}$  ( $10^7$  ビーズ)に×20ハイブリダイゼーション液(クエン酸ナトリウム(二水塩、以下同じ)8.8%、NaCl 17.5%、ウシ血清アルブミン2%、ポリビニルピロリドン2.0%、ドデシル硫酸ナトリウム4.0%)10  $\mu\text{l}$  を加え、40pmolの<sup>32</sup>P 標識したantiTDH1 (TDH1の相補鎖)プローブ20  $\mu\text{l}$  を加え、50℃で15分間ハイブリダイゼーション後、15,000rpm で5分間遠心し上清を除き、洗浄液1(クエン酸ナトリウム0.44%、NaCl 0.875%、ドデシル硫酸ナトリウム1%)1mlに粒子を懸濁させ、50℃で5分間洗浄し、15,000rpm で5分間遠心し上清を除いた。同様に洗浄液2(クエン酸ナトリウム0.44%、NaCl 0.875%、トリトンX-100 1%)、洗浄液3(クエン

酸ナトリウム0.44%、NaCl 0.875%)で洗浄した。40 $\mu$ lの水に再懸濁した粒子の10 $\mu$ lをメンブレンフィルター(0.22 $\mu$ m)で濾過し、1mlの水で5回洗浄した後、メンブレンフィルター上の粒子の<sup>32</sup>Pをシンチレーションカウンター(アロカ社)で測定した。結果は652,000CPMで粒子1個当たり約177,000分子のTDH1プローブが結合されていた。その結果、微粒子1個当たり約81,800分子のTDH1プローブが結合されていた。

【0028】(実施例3)核酸プローブ結合蛍光粒子の調製

蛍光ビーズとしてはポリサイエンス社(Polyscience Inc., USA)製のフルオーズブライトカルボキシレイトミクロスフェア(Fluoresbrite Carboxylate Microsphere No 17147)を用いた。実施例2と同様にして100 $\mu$ lの粒子(1.15 $\times 10^8$ 粒子)、2.5 $\mu$ molのEDC及び250 $\mu$ molのTDH2プローブを反応させた後、洗浄、再懸濁(HEPES緩衝液、115 $\mu$ l)し、超音波処理した後、4℃で保存した。

【0029】(実施例4)ハイブリダイゼーション反応の蛍光光度計による測定

A. 蛍光光度計による検量線の作成

蛍光光度計は日立650-10型を用いた。フルオレスブライトカルボキシレイトミクロスフェア87 $\mu$ l(10<sup>8</sup>)粒子を100 $\mu$ lの4N-NaOHで溶解し、1N-HClで中和し、リン酸緩衝液(10mM, pH7.0)で希釈し、10mlとした。この溶液の1/10、3/10の希釈液を作り、10粒子/ml $\sim$ 10<sup>7</sup>粒子/mlに相当する蛍光溶液を得た。これらの溶液を463nm励起、528nm受光、PMT Gain:High、励起スリット幅10nm、受光スリット幅10nmで測定し、検量線を得た(第2図)。この蛍光粒子1個の蛍光強度はFIT換算で、2.7 $\times 10^8$ 分子に相当すると算出された。

NCCCCGGTTC TGATGAGATA TTGTT 25

【配列表】

【0033】配列番号:2

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成核酸

配列の特徴

特徴を表す記号:modified base

NCAGGTACTA AATGGCTGAC ATCCT 25

【図面の簡単な説明】

【図1】蛍光微粒子と磁性微粒子を用いた核酸プローブの反応を説明する図である。

【図2】実施例4における蛍光粒子の検量線を示す。

【図3】実施例4における腸炎ビブリオDNAの検量線を示す。

【符号の説明】

\*【0030】B. ハイブリダイゼーション反応

TDH1プローブ標識磁性粒子1 $\mu$ l(1.0 $\times 10^6$ ビーズ)、TDH2プローブ標識蛍光粒子1 $\mu$ l(1.0 $\times 10^6$ ビーズ)、熱変性した腸炎ビブリオDNA抽出液80 $\mu$ l、及びハイブリダイゼーション液38 $\mu$ lを混合し、50℃で15分間ハイブリダイゼーションを行った後、磁石で磁性粒子を試験管壁に集め、反応液をアスピレーターで吸引除去後、実施例2と同様な反応液を添加洗浄した後、100 $\mu$ lの4N-NaOHで粒子を溶解し、1N-HClで中和後、リン酸緩衝液(10mM, pH7.0)で希釈し、2mlとし、蛍光光度計で測定した。

【0031】C. 結果

結果を第3図に示した。5 $\times 10^8$ ~5 $\times 10^6$ ゲノム/mlが定量的に測定できた。

【配列表】

【0032】配列番号:1

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成核酸

配列の特徴

特徴を表す記号:modified base

存在位置:1

特徴を決定した方法:E

他の情報:5-(N-(7'''-アミノヘプチル)アクリルアミド-2''-イル)デオキシウリジン(5-(N-(7'''-amino heptyl)acrylamido-2''-yl)deoxy uridine)

存在位置:2..25

40 他の特徴:ビブリオパラヘモリティカス(Vibrio parahaemolyticus)の耐熱性毒素(thermostable direct hemolysin:TDH1)産生部位に相補的配列

※存在位置:1

特徴を決定した方法:E

他の情報:5-(N-(7'''-アミノヘプチル)アクリルアミド-2''-イル)デオキシウリジン(5-(N-(7'''-amino heptyl)acrylamido-2''-yl)deoxy uridine)

存在位置:2..25

40 他の特徴:ビブリオパラヘモリティカス(Vibrio parahaemolyticus)の耐熱性毒素(thermostable direct hemolysin:TDH2)産生部位に相補的配列

※ 25

★図1中、1は標的核酸、2は共存する核酸、3は標的核酸の特異的な配列a、4は標的核酸の他の特異的な配列b、5は3の配列に相補的な配列を持った核酸プローブ、6は4の配列に相補的な配列を持った核酸プローブ、7は磁性粒子、8は蛍光粒子を示す。9は7の磁性粒子同士の自然または非特異的凝集、10は8の蛍光粒子同士の自然または非特異的凝集、11は標的核酸と3

**\* NOTICES \***

**Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The high sensitivity detecting method of the ligand receptor reaction which measures the specimen material concentration in the sample solution using the ligand receptor reaction which consists of the following processes.

a. The fluorescence particle of fluorescence wavelength [X] which combined the matter alternatively combined with a part [a] with the singularity in a specimen material [A-X], A different magnetic particle from the above in a specimen material [a] which combined the matter alternatively combined with a part [b] with singularity [B-M], Make three of the sample solutions containing a specimen material react at predetermined time and predetermined temperature, and both fluorescence particle [A-X] and magnetic particle [B-M] are specifically combined with a specimen material. b. Place the mixed liquor obtained by process a. all over a magnetic field, and a fluorescence particle [A-X] without the floc of a magnetic particle [B-M] and a fluorescence particle [A-X], and a magnetic particle [B-M] and magnetism is separated. c. In addition to the fluorescence particle which combined with the magnetic particle the solution which dissolves a fluorescence particle [A-X], the solution of fluorescence is created, from the fluorescence intensity of the d. above-mentioned fluorescence solution, the number of the flocs of [A-X] and [B-M] produced by the specimen material is computed, and the specimen material concentration in the sample solution is computed.

[Claim 2] The high sensitivity detecting method of the ligand receptor reaction of claim 1 a specimen material is DNA or RNA and the matter combined alternatively is an oligonucleotide.

[Claim 3] The high sensitivity detecting method of the ligand receptor reaction of claim 1 which a specimen material is an antigen or an antibody and is the antibody or antigen with which the matter combined alternatively corresponds.

[Claim 4] The high sensitivity detecting method of the ligand receptor reaction of claim 1 a specimen material is a physiological active substance and the matter combined alternatively is the receptor.

[Claim 5] The high sensitivity detection kit of the ligand receptor reaction which measures the specimen material concentration in the sample solution using a ligand receptor reaction characterized by incorporating a fluorescence particle [A-X] and a magnetic particle [B-M].

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the measurement kit for enforcing the method of detecting the specimen material concentration in the sample solution using a specific binding, and this approach. The analyte can apply especially this invention to the ligand-receptor detecting method analyzed by the intervention of the so-called "sandwiches" reaction.

[0002] As the ligand receptor detecting method for using a specific binding, the application to the immunoassay which specifically uses an antigen-antibody reaction, the nucleic-acid-probe measurement using the complementarity of a nucleic acid, measurement using the specific binding of hormone, other physiological active substances, and its receptor, etc. is possible for this invention. By using this invention, measurement which requires the complicated technique although it is these high sensitivity can be performed quickly and easily. As for this invention, the application to a diagnosis of a hereditary disease, cancer, an infectious disease, \*\*\*\*\*, etc. is expected as a measuring method with singularity high again.

[0003]

[Description of the Prior Art] The ligand receptor detecting method is a measuring method with high singularity, and has come to be used widely as an effective means for diagnoses, such as a hereditary disease, cancer, an infectious disease, and \*\*\*\*\*. The immunoassay using an antigen-antibody reaction is detection of pathogenic microorganisms, such as hormone measurement of measurement of the tumor marker which makes CEA and AFP the start, TSH, an insulin, etc., a hepatitis B virus, and rotavirus, a toxigenic-Escherichia-coli toxin, and Clostridium difficile. It carries out in the large range, such as detection of pathogen factors, such as a toxin, and antibody inspection which looks at generation of the antibody in an infectious disease.

[0004] The nucleic-acid-probe measurement using the complementarity of a nucleic acid has come to be widely used as a measuring method with singularity high in recent years. For example, a diagnosis of congenital gene diseases, such as gun related genes, such as sexually transmitted diseases, such as viral infectious diseases, such as hepatitis B, hepatitis C, and AIDS, papillomavirus, chlamydia, and Neisseria gonorrhoeae, and a gun gene, and a gun inhibitor, a hemophilia, and myotrophia dystonica, diabetes mellitus, hypertension, etc., an abnormality of the genes, etc. have come to be used extensively. Moreover, the specific measuring method using hormone, a physiological active substance, and its acceptor has also come to be used. For example, the reaction of the matter and lectin containing a saccharide, interleukin 2, that receptor and acetylcholine, its receptor, a biotin, avidin, etc. go into this \*\*\*\*. Moreover, since a cholera toxin and the heat-labile enterotoxin of toxigenic Escherichia coli combine with the ganglioside of an intestinal tract, the measuring method of these toxins using this ganglioside is also reported.

[0005] These measuring methods are measuring methods which accomplished the advance rapid as technique in which sensibility is high in recent years. Much of such technique uses the measuring method called a sandwich technique. That is, the ligand used as the measuring object is put and



measured by two kinds of receptors. Joint support of one side of a receptor is carried out at insoluble support, a measurable indicator is combined with the receptor of another side, and it is made to react with the ligand of the measuring object. It reacts specifically so that ligand may be put by the solid phase receptor and the indicator receptor at this time, and association of a solid phase receptor-ligand-indicator receptor arises, and a marker is combined with solid phase as a result. The amount of the marker combined with this solid phase is proportional to the amount of ligand used as the measuring object in a specimen, and can measure the amount of ligand by measuring the amount of this marker. [0006] As solid phase, the polymer support of polystyrene, nylon, acrylamide, a dextran, agarose, etc. is used well. Moreover, an erythrocyte etc. may be used. As a configuration, a latex bead, a microplate, a test tube, the film, etc. are various.

[0007] Generally radioisotope, an enzyme, a fluorescent material, photogene, an enzyme substrate, etc. are used as a marker. Moreover, condensation of latexes may be measured with a latex bead. Although the number of markers influences the sensibility of the detecting method greatly, per receptor 1 molecule, generally, markers are hundreds molecules, even when many [extraordinarily], one molecule - dozens molecules, and, and installation of a marker has a limit.

[0008] Generally such technique is the united things (bound). Actuation of separating what (free) was not combined is carried out. High sensitivity measurement is attained according to this B/F separation. By this technique, it is the big point which can remove the indicator receptor of isolation (free). Therefore, B/F separation is important in this technique, therefore that actuation is also complicated, and it also requires time amount. It is the EMIT method (enzyme multiplied immunoassay technique) as an approach of not performing B/F separation. It was reported (Rubenstein, KE. et.al.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 846, 1972). By this approach, using an enzyme as an indicator, if an antibody combines with an antigen, change will arise in the active site of an enzyme (activation or activity inhibition), and change of that activity is measured. The method of having combined the enzyme substrate with the antigen as an indicator by the same technique is commercialized (SLFIA; Substrate-labeled fluorescent immunoassay; Ames shrine). When this makes the antigen and labelled antigen in a specimen compete, an antibody and the indicator substrate which reacted are the technique it cannot become the substrate of the enzyme later added for steric hindrance, only the labelled antigen of isolation serves as a substrate of an enzyme reaction, and the amount of the product by the enzyme is proportional to the amount of the antigen in a specimen.

[0009] Moreover, the technique called an immunofluorescence depolarization method was developed. By this method, if the antigen which carried out fluorescent labeling is made to react with an antibody, the Brownian motion of a fluorescence labelled antigen will be restricted, and if indicator fluorescence is excited by polarization, it will use that the dissolution of polarization is controlled. In this case, the competing method is used, and only a drug and low-molecular matter like hapten can be measured, and it cannot apply to macromolecules, such as protein.

[0010] On the other hand, there is an approach using peroxidase labeling as homogeneous assay of a giant molecule. That is, when a peroxidase is used as an indicator and the concentration of the hydrogen peroxide which is a substrate is maintained at a high condition at the time of the activity measurement of an enzyme, it is the approach that it is prevented with the unreacted namely, hydrogen peroxide of high concentration [peroxidase / of isolation], activity is not shown, the peroxidase incorporated in the immune complex by the antigen-antibody reaction on the other hand is not exposed to a high-concentration hydrogen peroxide according to steric hindrance, and activity is shown. However, by this approach, by the hemolysis specimen, it is known that false positivity is shown with the catalase Mr. activity in a corpuscle, and there is a singularity top problem.

[0011] Although B/F separation generally is not performed in measurement by latex condensation and hemagglutination, these are used as screening inspection and sensibility is not high. The approach of measuring latex condensation with a particle metering device is already indicated (others [Maeda / Makiko]; a Japan Society for Clinical Laboratory Automation meeting magazine, 14 and 231, 1990., \*\*\*\*\* No. 502875 [63 to] official report). Such technique is approaches of detecting whether each particle being floc or it being non-floc in case a particle is detected, and is isolation (free) and

association (bound) at the time of detection. Since it can judge, sensibility is high and is the simple approach which does not need the washing actuation as pretreatment. In order to attain high sensitivity by this approach, it is detecting correctly using the smallest possible particle of particle size distribution, whether a particle's being a simple grain child, or your being two or more two or more grain children. It is difficult to keep the particle size distribution of a particle as small as possible, and attaining this influences the manufacturing cost of a particle as it is. Moreover, by making the accuracy of measurement of measuring equipment high, detecting correctly whether a particle is a simple grain child or you are two or more two or more grain children needs an expensive device, although it is possible. Since distribution of this particle is not easy, the concentration of ligand is low, although maintaining at a distributed condition by making a particle into a simple-grain child on the other hand, i.e., controlling two or more grain child-ization of the particle by spontaneous agglutination, leads to the improvement in sensibility of this method, when there is very little condensation, discernment of what reacted with ligand and was condensed, or the thing to depend on spontaneous agglutination is difficult, and the measurement below the particle number of spontaneous agglutination becomes impossible. Therefore, the sensitometry of this approach does not have a general enzyme-labeling sandwich technique and great difference, and sensibility is lower than a radioactive indicator method.

[0012]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is offering the approach of attaining the high sensitivity assay which carries out separation distinction, measures condensation of the particle by the reaction with ligand from the spontaneous agglutination of a particle in the approach of measuring latex condensation with a particle metering device, and can be measured to low-concentration ligand. Other purposes of this invention are offering the approach of introducing a lot of indicators into a receptor in the ligand receptor detecting method. This invention also offers the measurement kit further used for the detection approach concerned.

[0013]

[Means for Solving the Problem] This invention is the high sensitivity detecting method of the ligand receptor reaction which measures the specimen material concentration in the sample solution using the ligand receptor reaction which consists of the following processes.

a. The fluorescence particle of fluorescence wavelength [X] which combined the matter alternatively combined with a part [a] with the singularity in a specimen material [A-X], A different magnetic particle from the above in a specimen material [a] which combined the matter alternatively combined with a part [b] with singularity [B-M], Make three of the sample solutions containing a specimen material react at predetermined time and predetermined temperature, and both fluorescence particle [A-X] and magnetic particle [B-M] are specifically combined with a specimen material. b. Place the mixed-liquor obtained by process a. all over a magnetic field, and a fluorescence particle [A-X] without the floc of a magnetic particle [B-M] and a fluorescence particle [A-X], and a magnetic particle [B-M] and magnetism is separated. c. In addition to the fluorescence particle which combined with the magnetic particle the solution which dissolves a fluorescence particle [A-X], the solution of fluorescence is created, from the fluorescence intensity of the d. above-mentioned fluorescence solution, the number of the flocs of [A-X] and [B-M] produced by the specimen material is computed, and the specimen material concentration in the sample solution is computed.

[0014] Moreover, this invention is the high sensitivity detection kit of the ligand receptor reaction which measures the specimen material concentration in the sample solution characterized by incorporating a fluorescence particle [A-X] and a magnetic particle [B-M] using a ligand receptor reaction. In this invention, it is specific to a specimen material and a specimen material is made into a sandwiches condition by the particle of a different property (fluorescence and magnetism) combined with the part to which specimen materials differ, an unreacted fluorescence particle is removed using magnetism and the fluorescence particle which reacted is measured with a fluorophotometer.

[0015] Hereafter, this invention is explained to a detail (refer to drawing 1 ). In the high sensitivity detecting method of the ligand receptor reaction which measures the specimen material concentration in the sample solution using the ligand receptor reaction which consists of the following processes a. The

fluorescence particle of fluorescence wavelength [X] which combined the matter alternatively combined with a part [a] with the singularity in a specimen material [A-X], A different magnetic particle from the above in a specimen material [a] which combined the matter alternatively combined with a part [b] with singularity [B-M], Three of the sample solutions containing a specimen material are made to react at predetermined time and predetermined temperature, and both fluorescence particle [A-X] and magnetic particle [B-M] are combined with a specimen material.

[0016] The specimen material in a sample is DNA or RNA in the nucleic-acid-probe measurement which is an antigen or an antibody in the immunoassay using an antigen-antibody reaction, and uses the complementarity of a nucleic acid, and are hormone, a toxin, etc. in measurement using the specific binding of a physiological active substance and its receptor. The part with the singularity in a specimen material means a part with the singularity which represents a specimen material with a part of specimen material. That is, it is important to choose the specific part which does not show other matter and cross reactions in an antigen-antibody reaction, nucleic-acid-probe measurement, etc.

[0017] A fluorescence particle means the particle which combines or contains a fluorescent material. FIKOBIRI proteins, such as xanthene ring content colors, such as a fluorescein, rhodamine 6G, and eosine Y, umbelliferone, a coumarin ring content color of coumarin 6 grade, an acridine color, phycoerythrin, and allophycocyanin, the Benz imidazole ring content color, a phenan SURIJUMU system color, an azine system color, a thoxanthene system color, a thiazin system color, a cyanine system color, a styryl system color, an oxazine system color, a thoria reel methane system color, a diaryl methane system color, others, etc. are chosen as a fluorescent material. Moreover, as a material of a particle, if specific gravity can distribute in a water solution by 0.9-2.0, any particles can be used. For example, a thing like biological particles, such as fixed erythrocytes, such as polystyrene, polyvinyl toluene, polymethylmethacrylate, the poly divinylbenzene, the poly acrolein, polybutadiene and a industrial latex particle of these mixed presentations or paper mulberry tree pollen, a mushroom spore, a hen, and a sheep, a Homo sapiens fixed lymphocyte, and fixed thymocyte, is chosen. As such a fluorescence particle, for example, the KOBASUFEAZU (Covaspheres TM) fluorescence particle of a Dewey scientific (Duke Scientific Corp.) company, A biotechnology curine (Bioclean) fluorescence particle, the micro bead alignment standard (MicrobeadsAlignment Standards) particle of a flow-cytometry standard (Flowcytometry Standard Corp.) company, The SHIRI (Serie) PSI fluorescence particle of Rhone Poulenc S.A. (Rhone-Poulenc Specialities Chimiques), The full OZU bright carboxylate (FluoresbriteTM Carboxylate) particle of Polyscience (Polyscience), The poly bead (Polybead) fluorescence particle, the full ORESSENTO alignment standard (Fluorescent Alignment Standard) particle of a coal tar electronics (Coulter Electronics) company, The fluoro trawl (Fluorotrol) GF, others, etc. of the hen erythrocyte of glutaraldehyde immobilization of a sigma (Sigma) company, a Meleagris gallopavo erythrocyte, and an orthochromatic diamond GUNOSU tick (Ortho Diagnostic) company are chosen.

[0018] Association of an alternative cementing material and a particle can be easily carried out by the approach generally learned as the condensation reaction and crosslinking reaction of two functional groups. For example, it can carry out by the covalent bond by bridge formation of the amino groups by glutaraldehyde, and bridge formation with the amino group and carboxyl group by the carbodiimide, the insertion reaction by the photolysis of azide, the exchange reaction of the amino group and a tosyl group, the ionic bond of the amino group and a carboxyl group, etc. Moreover, a particle front face can prevent nonspecific association by performing inactivation processing, after combining an alternative cementing material. This inactivation processing is attained by processing the approach and the unreacted functional group which are processed by the salmon sperm DNA partial decomposition product, the random oligonucleotide, bovine serum albumin, etc. by well-known approaches, such as ethanolamine.

[0019] The particle which contains magnetic powder as a magnetic particle can be used. this -- for example, the ESUTA ball (estapor) of loan PURAN and the DINA bead (dynabeads) of a dynal company etc. -- it is chosen.

[0020] b. Place the mixed liquor obtained by process a. all over a magnetic field, and separate a

fluorescence particle [A-X] without the floc of a magnetic particle [B-M] and a fluorescence particle [A-X], and a magnetic particle [B-M], and magnetism. This actuation separates the particle (nonspecific condensation of magnetic particle independence and magnetic particles, and connective of the magnetic particle through a specimen material, and a fluorescence particle) which has magnetism, and a particle (nonspecific condensation of fluorescence particle independence and fluorescence particles) without magnetism by applying a magnetic field to reaction mixture.

[0021] c. In addition to the fluorescence particle which combined with the magnetic particle the solution which dissolves a fluorescence particle [A-X], create the solution of fluorescence. It is also possible to add a fluorescence particle solution to the fluorescence particle which did not react, to dissolve a fluorescent material into liquid, and to obtain a fluorescence solution. In the case of polystyrene etc., in the case of NaOH and a industrial latex particle, as a solution which dissolves a fluorescence particle, the presentation of a particle can use organic solvents, such as dimethylformamide and dimethyl sulfoxide, etc.

[0022] d. From the fluorescence intensity of the above-mentioned fluorescence solution, compute the number of the flocs of [A-X] and [B-M] produced by the specimen material, and compute the specimen material concentration in the sample solution.

[0023] Measurement of fluorescence intensity can be measured using a common fluorophotometer. Generally, since a receptor is fixed to solid phase in the ligand receptor detecting method, it is known that a reaction rate will become slow compared with the reaction of the liquid phase. However, by this invention, it is possible to control the fall of a reaction rate by using a particle, and it can control further by stirring reaction mixture. Therefore, disadvantageous profit of the reaction rate fall by using solid phase can be suppressed. After carrying out B/F separation by the approach of this invention using the particle which has magnetism, it is possible to dissolve a fluorescence particle with a solution and to measure fluorescence as the liquid phase.

[0024]

[Effect of the Invention] Generally fluorometry is known as a measuring method of high sensitivity. Carrying out sandwiches measurement by making a fluorescent material into a marker is also known well. However, in fluorescent labeling, even if the receptor of one molecule reacts to the ligand of one molecule, it does not pass over the molecularity of a marker to the number of tagged molecules on a receptor, but it is 1 - only hundreds molecules. Therefore, there are few fluorescence molecules measured even if fluorometry is high sensitivity. On the other hand, by the approach using a fluorescence particle, the fluorescent material content in one fluorescence particle exists in large quantities about with 1010 by FIT conversion, if a particle with many amounts of fluorescence is selected, but since it exists in a particle, in suspension, is considered as uneven distribution and cannot measure all the fluorescent materials in a particle. This invention is a high sensitivity measuring method which has the indicator method which dissolves this particle with a solution, can measure all the fluorescent materials in a particle efficiently by measuring as a uniform system, and introduces a lot of fluorescence into the high sensitivity of fluorometry, and the reaction of one molecule.

[0025] In ligand receptor measurement, by dissolving this fluorescence particle and measuring in the state of homogeneity as a solution, using a fluorescence particle as an indicator, effectiveness equivalent to the case where an indicator is introduced into a receptor so much could be acquired, and high sensitivity measurement was able to be attained in this invention.

[0026]

[Example] Although effectiveness of this invention is made still clearer by below illustrating the example of this invention, the range of this invention is not limited by these examples.

(Example 1) The complementary oligonucleotide was used for the heat-stable enterotoxin of *Vibrio parahaemolyticus* as a preparation nucleic acid probe of a nucleic acid probe. An oligonucleotide is a DNA synthesis machine. 380A It compounded with the phospho aminodite method using the mold (applied biotechnology systems company). The base sequence is as follows and was shown also in array tables 1 and 2.

5'-CCCCGGTTCT GAXGAGATAT TGTN-3' (TDH1) And N shows the deoxyuridine which has a

linker arm in the 5th place during 5'-CAGGTACTAA AXGGTTGACA TCCTN-3' array (TDH2). The deoxyuridine which has a linker arm in the 5th place of these is \*\*\*\*\* 60-500717. With the synthesis method indicated by the number official report, it prepared by chemosynthesis from deoxyuridine and introduced into the oligonucleotide. The compounded oligonucleotide is 55 degrees C and 4 with 27% aqueous ammonia. After performing time amount deprotection processing, it refined using anion-exchange high-performance-chromatography Mono-Q FPLC (Pharmacia Corp.). 0.2 mumol The scale was compounded and the oligonucleotide of about 11.5A260 (absolute magnitude calculated from the absorbance in 260nm) was obtained.

[0027] (Example 2) as the preparation magnetic particle of a nucleic-acid probe-coupling nature magnetic particle -- DINO in dust rear company (Dyno Industrier A.S., Norway) make -- XP-6006 were used. magnetic particle 100 mul TDH1 probe prepared in the example 1 132pmol -- 1mM boric-acid buffer solution (pH8) it mixes in inside (last volume 200microl), and is made to react at 37 degrees C for 4 hours -- 250microl The monoethanolamine hydrochloric-acid water solution was added and was made to react for 30 more minutes. 789microl after it collects magnetic particles with a magnet and 1ml water washes 5 times after removing reaction mixture after reaction termination It re-suspends in the HEPES buffer solution (20mM, pH 7.0, and 1% BSA are included), and is sonication (for 20kHz, 50W, and 2 seconds). It carried out and saved at 4 degrees C. The number of probes combined with the particle was measured by the following approaches. It is x20 hybridization liquid (sodium citrate (2 monohydrate)) in 10micro (107 bead) of TDH1 probe-coupling green fluorescence particle suspension I. They are the 8.8 same% and NaCl below. 17.5%, 2% of bovine serum albumin, Polyvinylpyrrolidone 2.0% and sodium-dodecyl-sulfate 4.0% 10microl It adds. 32P of 40pmol(s) antiTDH1 (complementary strand of TDH1) probe 20microl which carried out the indicator It adds. They are after hybridization and 15,000rpm for 15 minutes at 50 degrees C. Carry out an at-long-intervals alignment for 5 minutes, and supernatant liquid is removed. Penetrant remover 1(0.44% [ of sodium citrates ], NaCl 0.875%, 1% of sodium dodecyl sulfate)1ml is made to suspend a particle, and it washes for 5 minutes at 50 degrees C, and is 15,000rpm. Except for [ an at-long-intervals alignment is carried out for 5 minutes, and ] supernatant liquid. It washed similarly by the penetrant remover 2 (% [ of sodium citrates / 0.44 ], NaCl 0.875%, X-100 1% of tritons), and the penetrant remover 3 (% [ of sodium citrates / 0.44 ], NaCl 0.875%). 40microl 10microl of the particle re-suspended in water 32P of the particle on a membrane filter after it filters with a membrane filter (0.22 micrometers) and 1ml water washes 5 times It measured with the scintillation counter (Aloka). A result is per [ 177,000 / about ] particle at 652,000CPM. TDH1 probe of a molecule was combined. Consequently, TDH1 probe of about 81,800 molecules was combined per particle.

[0028] (Example 3) As preparation fluorescence BISU of a nucleic-acid probe-coupling fluorescence particle, the Polyscience (Polyscience Inc., USA) FURUOZU bright carboxylate microsphere (Fluoresbrite Carboxylate Microsphere No17147) was used. an example 2 -- the same -- carrying out -- 100microl A particle (1.15 x10<sup>8</sup> particle) and 2.5 mumol EDC -- and -- After making TDH2 probe of 250pmol react, re-suspension (HEPES buffer solution and 115microl) was carried out, and washing and after ultrasonication, it saved at 4 degrees C.

[0029] (Example 4) The creation fluorophotometer of the calibration curve by the measurement A. fluorophotometer by the fluorophotometer of a hybridization reaction is Hitachi. 650-10 The mold was used. FURUORESUBURAITO carboxylate micro fair 87microl (108) It is a particle 100 mul 4 N-NaOH It dissolves, neutralizes by 1 N-HCl, and is a phosphate buffer solution (10mM, pH7.0). It diluted and could be 10ml. The diluent of 1/10 of these solutions and 3/10 is made, and it is 10 particle / ml - 107. A particle/ml The corresponding fluorescence solution was obtained. These solutions It measured with 463nm excitation, 528nm light-receiving, PMT Gain:High, the excitation slit width of 10nm, and the light-receiving slit width of 10nm, and the calibration curve was acquired. (Fig. 2) . The fluorescence intensity of this one fluorescence particle is 2.7x10<sup>9</sup> by FIT conversion. It was computed when equivalent to the molecule.

[0030] B. Hybridization reaction TDH1 probe indicator magnetic particle 1microl (1.0x10<sup>6</sup> bead), TDH2 probe indicator fluorescence particle 1microl (1.0x10<sup>6</sup> bead), Vibrio parahaemolyticus DNA

extract 80microl which carried out thermal denaturation, and hybridization liquid 38microl It mixes. After performing hybridization for 15 minutes at 50 degrees C, a magnetic particle is brought together in a test tube wall with a magnet. 100 after carrying out addition washing of the same reaction mixture as an example 2 for reaction mixture after suction removal with an aspirator mul 4 N-NaOH A particle is dissolved and they are after neutralization and a phosphate buffer solution (10mM, pH7.0) at 1 N-HCl. It diluted, was referred to as 2ml, and measured with the fluorophotometer.

[0031] C. The result result was shown in Fig. 3.  $5 \times 10^3$  to  $5 \times 10^6$  A genome/ml It has measured quantitatively.

[Layout Table]

[0032] array number: -- die-length [ of one array ]: -- mold [ of 25 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- single strand topology: -- notation:modified base existence location: showing the description description of a nucleic-acid convolution kernel acid array besides class: of a straight chain-like array -- information: besides approach:E which determined one description -- 5- (N- ()) [ 7"-] Amino heptyl Acrylamide-2"- IRU PARAHEMORI tee dregs Deoxy one () Uridine (5-(N-(7"-aminoheptyl) acrylamido-2" - yl) deoxy uridine) existence location: -- description: besides 2..25 -- vibron [ Vibrio ] parahaemolyticus Heat-stable enterotoxin (thermostable direct hemolysin: TDH1) It is a complementary sequence to a production part. NCCCCGGTTC TGATGAGATA TTGTT 25 -- [Layout Table]

[0033] array number: -- die-length [ of two arrays ]: -- mold [ of 25 arrays ]: -- number [ of nucleic-acid chains ]: -- single strand topology: -- notation:modified base existence location: showing the description description of a nucleic-acid convolution kernel acid array besides class: of a straight chain-like array -- information: besides approach:E which determined one description -- 5- (N- ()) [ 7"-] Amino heptyl Acrylamide-2"- IRU PARAHEMORI tee dregs Deoxy one () Uridine (5-(N-(7"-aminoheptyl) acrylamido-2" - yl) deoxy uridine) existence location: -- description: besides 2..25 -- vibron [ Vibrio ] parahaemolyticus Heat-stable enterotoxin (thermostable direct hemolysin: TDH2) It is a complementary sequence to a production part. NCAGGTACTA AATGGCTGAC ATCCT 25

---

[Translation done.]

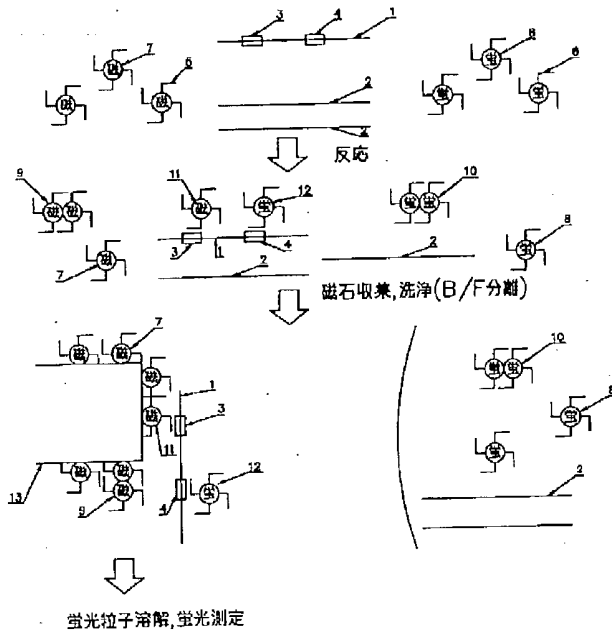
1 1

5のハイブリダイゼーションにより特異的に標的核酸1に結合した蛍光粒子、12は標的核酸と4-6のハイ

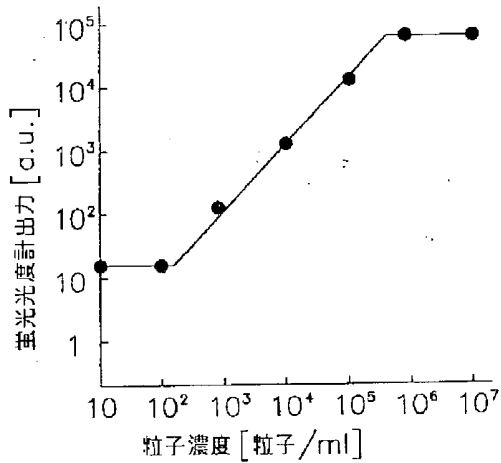
1 2

ブリダイゼーションにより特異的に標的核酸1に結合した蛍光粒子を示す。13は磁石を示す。

【図1】



【図2】



【図3】

